

• 药剂与工艺 •

女贞子三萜-胡椒碱共无定型复合物的表征和体外溶出度评价

余丹妮^{1*}, 伍薇¹, 祁玮玮¹, 王如意¹, 刘双双¹, 李俊松^{2*}

1. 中国药科大学 生物功能性材料重点实验室, 江苏 南京 211198

2. 南京中医药大学 江苏省中药炮制重点实验室, 江苏 南京 210046

摘要: 目的 制备女贞子三萜 (triterpenoids of *Ligustri Lucidi Fructus*, TLLF)-胡椒碱 (piperine, PIP) 共无定型复合物 (co-amorphous complex, CAC), 以提高 TLLF 的溶出度。方法 采用溶剂挥发法制备 TLLF-PIP-CAC, 运用粉末 X 射线衍射 (PXRD)、差示扫描量热法 (DSC)、扫描电子显微镜 (SEM) 对 TLLF-PIP-CAC 的微观结构进行表征, 通过热稳定性实验考察 TLLF-PIP-CAC 的稳定配比, 采用紫外-可见分光光度法 (UV-Vis) 和高效液相色谱法 (HPLC) 分别测定 TLLF、PIP 及 TLLF-PIP-CAC 中齐墩果酸 (OA) 和熊果酸 (UA) 或 PIP 的药物量, 运用傅里叶红外光谱 (FTIR) 对优选的 TLLF-PIP-CAC 各组分的相互作用进行分析, 并对其溶解和体外溶出行为进行考察, 以评价制剂的形成。结果 PXRD 结果表明, TLLF-PIP 质量比为 1:1 的 TLLF-PIP-CAC 为稳定的 CAC。SEM 图谱表明 TLLF-PIP-CAC 粒子呈类球形。FTIR 图谱提示, TLLF 主要分子及 PIP 分子间存在氢键相互作用。溶解和体外溶出实验表明, TLLF 在 TLLF-PIP-CAC 中的溶解和溶出均显著提高, 而 PIP 的溶出显著降低, 两者呈现伴随释放效应。结论 所制备的 TLLF-PIP-CAC 能显著提高 TLLF 的溶出度和 CAC 稳定性, 这一制剂为促进难溶性中药组分的复方配伍提供了一定的参考。

关键词: 女贞子三萜; 胡椒碱; 共无定型复合物; 溶出; 伴随释放; 复方配伍; 熊果酸; 齐墩果酸

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)03-0561-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.03.009

Characterization of co-amorphous complex with piperine and triterpenoids from *Ligustri Lucidi Fructus* and dissolution evaluation *in vitro*

YU Dan-ni¹, WU Wei¹, QI Wei-wei¹, WANG Ru-yi¹, LIU Shuang-shuang¹, LI Jun-song²

1. Key Laboratory of Biomedical Functional Materials, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

2. Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicines Processing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

Abstract: Objective To prepare a co-amorphous complex of piperine (PIP) and triterpenoids from *Ligustri Lucidi Fructus* (TLLF) to improve the dissolution of TLLF. **Methods** TLLF-PIP co-amorphous complex was prepared using solvent evaporation method. The microscopic structure of co-amorphous complex (CAC) was analyzed using differential scanning calorimetry (DSC), scanning electron microscopy (SEM), and powder X-ray diffraction (PXRD), the optimal ratio of the two components was investigated through the thermal stability experiment. Ultraviolet-visible spectrophotometry (UV-Vis) and high performance liquid chromatography (HPLC) were applied to determine the amount of TLLF, PIP and the individual components, ursolic acid (UA) and oleanolic acid (OA), respectively. The interaction of the optimal CAC was analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), and its solubility and dissolution behavior *in vitro* were also studied to evaluate the formation of the preparation. **Results** PXRD analysis indicated that the TLLF-PIP-CAC with a mass ratio of 1:1 exhibited a stable amorphous state, which particles presented in near-spherical shape. FTIR results indicated that there are some hydrogen interactions between the moleculars of TLLF and PIP. The solubility and dissolution determination exhibited a pairwise released behavior with improved triterpenoids and decreased piperine

收稿日期: 2017-08-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81403118)

作者简介: 余丹妮 (1975—), 女, 博士, 研究方向为中药及纳米材料新型给药系统研究。Tel: (025)86185151 E-mail: ydnaya@163.com

*通信作者 李俊松 Tel: (025)85811063 E-mail: lijunsong1964@163.com

余丹妮 Tel: (025)86185151 E-mail: ydnaya@163.com

dissolution. **Conclusion** The prepared TLLF-PIP-CAC can significantly improve the dissolution and amorphous stability of TLLF, which may provide a reference for the compatibility of insoluble compound in traditional Chinese medicine.

Key words: triterpenoids from *Ligustri Lucidi Fructus*; piperine; co-amorphous complex; dissolution; pairwise release; compound compatibility; ursolic acid; oleanolic acid

女贞子 (*Ligustri Lucidi Fructus*, LLF) 为木犀科女贞属植物女贞的干燥成熟果实, 具有滋补肝肾、明目乌发、健膝壮骨等功效^[1], 临床上常以其组方用于更年期综合征、骨质疏松、冠心病、高血脂、高血糖和肝炎等疾病的治疗^[2-3]。女贞子药用有效成分主要为女贞子三萜 (triterpenoids of LLF, TLLF), 富含齐墩果酸 (oleanolic acid, OA) 和熊果酸 (ursolic acid, UA) 等五环三萜类物质 (图 1)。研究表明, TLLF 具有良好的药理活性, 但其口服生物利用度较低, 其中 UA 和 OA 均属生物药剂学分类中的 IV 类药物, 即低溶解低渗透, 这在很大程度上限制了三萜类物质活性的发挥。

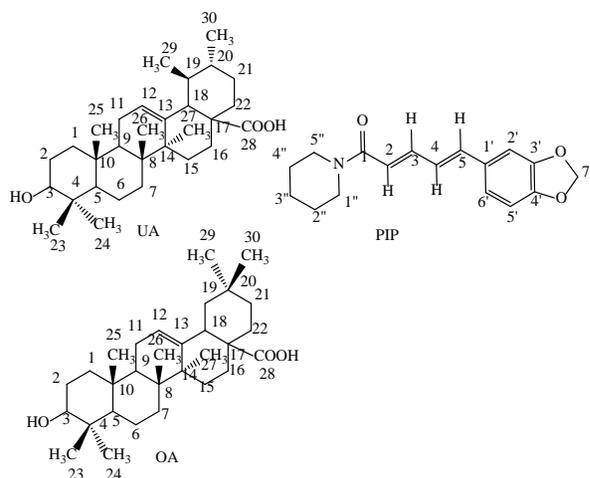


图 1 UA、OA 和 PIP 化学结构图

Fig. 1 Chemical structure of UA, OA, and PIP

为提高五环三萜类药物的生物利用度, 医药工作者利用表面活性剂增溶技术、药物微粉化、固体分散体、包合技术、自(微)乳化技术^[4-8]等在制剂领域进行了大量尝试, 但以上技术由于在制备中加入了大量辅料, 有可能对以复方为主的中药成分的配伍产生干扰, 同时, 辅料的添加也增大了给药剂量。因此, 选用新型的提高萜类难溶性物质生物利用度的方法是促进药物复方配伍的关键。

共无定型技术是指将难溶性晶态药物与辅料或其他药物小分子通过溶剂或研磨等方法, 转变成无定形, 以提高药物的稳定性及溶出速率的制备技术。其中, 2 种不同药物制备的药物-药物共无定型复合物 (co-amorphous complex, CAC) 最具研发潜力,

它不但可提高 2 种难溶性药物的水溶性及溶出速率^[9], 还能增强疗效和降低药物的毒副作用^[10], 部分体系甚至具有协同释药的潜力^[11], 这为联合用药, 特别是 2 种及 2 种以上水难溶性药物的联合给药提供了新思路。

胡椒碱 (piperine, PIP, 图 1) 属于桂皮酰胺类生物碱, 在自然界中广泛存在, PIP 具有抗氧化、免疫调节和抗肿瘤作用^[12], 具有与 TLLF 相似的对药物所致肝损伤的保护作用^[13-14], 两者口服有效浓度相近 (OA: 20~300 mg/kg, UA: 15~60 mg/kg^[15], PIP: 25~100 mg/kg)。近几年 PIP 作为生物利用度增强剂备受关注, 大量临床前和临床研究表明, PIP 能提高许多结构和药理作用不同的药物在人或动物体内的口服生物利用度, 且毒性较低^[16-17]。本实验将 TLLF 与 PIP 通过溶剂法制备成 TLLF-PIP-CAC, TLLF 中含有羟基和羧基基团, 可作为质子的供体, 而 PIP 中含有羰基基团, 可作为质子受体, 两者之间可能形成氢键, 借助于 TLLF 与 PIP 形成的无定型的高能态及两者间的非共价键相互作用可增加 TLLF 的溶解和溶出, 利用 PIP 的促吸收和代谢抑制作用, 最终提高 TLLF 的口服生物利用度, 实现药物之间的良好配伍。

1 仪器与材料

TU-1810 紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; S-4800II FESEM 场发射扫描电子显微镜, 日本日立公司; FTIR-8400S 傅里叶变换红外光谱仪, 日本岛津公司; Bruker D8 Advance X 射线衍射仪 (XRD), 德国 Bruker 公司; NETZSCH DSC 204 差示扫描量热仪, 德国耐池公司; Agilent 1260 Series 高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; ZRS-8G 型智能溶出试验仪, 天津大学无线电厂。

女贞子 (木犀科女贞属植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实, 经中国药科大学药教研室李会军教授鉴定, 符合《中国药典》2015 年版标准) 购自河南君利生物科技有限公司; UA 对照品 (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 YAO505YA14) 购自上海源叶生物科技有限公司; OA 对照品 (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 110709-201206) 购自中国食品药品检定研究院; 对照品 PIP (质量分数 $\geq 98\%$, 批号

B160525)、PIP(质量分数 $\geq 95\%$,批号 ZL150200)、UA(质量分数 $\geq 95\%$,批号 160420)、OA(质量分数 $\geq 95\%$,批号 160724)均购自南京泽朗医药科技有限公司;SP-825 大孔吸附树脂,日本三菱化学株式会社;甲醇为色谱纯,水为高纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

2.1.1 女贞子三萜-胡椒碱共无定型复合物(TLLF-PIP-CAC)的制备 取女贞子药材适量,以 15 倍量 95%乙醇提取 3 次,每次 2 h,提取液浓缩,SP-825 型大孔树脂上样,分别用蒸馏水、50%乙醇和 95%乙醇洗脱,收集 95%乙醇洗脱液,回收乙醇,剩余固体用 95%乙醇溶解并重结晶 2 次,将所得白色晶状混合物真空干燥,即得女贞子三萜提取物。按照“2.2”项下色谱条件测定,计算其总三萜质量分数,结果表明 TLLF 得率为 0.19%,提取物中总三萜质量分数为 80.2%。

按照 TLLF 提取物中总三萜与 PIP 质量比为 1:1、1.5:1、2:1 分别精确称定药物,加入适量甲醇溶解并充分混匀,45 °C 减压蒸发,挥去溶剂,将所得复合物置于硅胶干燥器中,4 °C 下保存备用。

2.1.2 TLLF 和 PIP 物理混合物的制备 按照 CAC 中总三萜与 PIP 的相同质量配比分别精确称取药物,于碾钵中适当研磨,混合均匀,备用。

2.2 女贞子总三萜定量测定(以 UA 计)^[18]

精密称取 UA 对照品 1 mg,置于 10 mL 量瓶中,无水乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得到 UA 0.1 mg/mL 的对照品储备液。准确移取对照品储备液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 分别置 10 mL 量瓶中,以无水乙醇稀释至刻度,摇匀。

精密移取以上样品溶液各 1 mL,置于 60 °C 水浴中挥干,依次加入 5%香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL 和高氯酸溶液 0.8 mL,水浴恒温 15 min,待溶液冷却至室温,将以上样品分别转移至 5 mL 量瓶中,以冰醋酸定容,摇匀,在波长 548 nm 处测定吸光度,以吸光度(Y)对质量浓度(X)进行回归,得总三萜的标准曲线方程为 $Y=0.01098X-0.1464$, $r=0.9997$,结果表明 UA 在 4~20 $\mu\text{g/mL}$ 与吸光度有良好的线性关系。

2.3 各组分的定量测定

2.3.1 色谱条件

(1)UA、OA^[19]:色谱柱为 KromaSil C₁₈ 柱(250

mm \times 4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水-冰醋酸-三乙胺(265:35:0.1:0.05);检测波长 210 nm;体积流量 1 mL/min;柱温 25 °C;进样量 20 μL 。理论塔板数以 UA 和 OA 计均不低于 3 000。

(2)PIP^[20]:色谱柱为 KromaSil C₁₈ 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水(77:23);检测波长 343 nm;体积流量 1.0 mL/min;柱温 30 °C;进样量 10 μL 。理论塔板数以 PIP 计不低于 3 000。

2.3.2 对照品溶液的制备 分别精确称取 OA、UA 对照品 1.75、1.69 mg 置于 5 mL 量瓶中,甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得到含 OA、UA 分别为 0.350、0.338 mg/mL 的对照品储备液。

精密称取 PIP 对照品 10.02 mg 置于 10 mL 量瓶中,甲醇溶解并稀释至刻度,得到含 PIP 1.002 mg/mL 的对照品溶液。

2.3.3 线性关系考察 精密吸取 UA、OA、PIP 对照品溶液各 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL,置于 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,按“2.3.1”项色谱条件进行 HPLC 分析,分别测定其对应峰面积的积分值(Y),以 Y 对质量浓度(X)进行线性回归,得标准曲线方程分别为 UA $Y=9.3705X-0.079$, $r=0.9998$,线性范围 46.1~1 475.2 ng/mL; OA $Y=13.740X-19.85$, $r=0.9998$,线性范围 180.0~2 160.0 ng/mL; PIP $Y=38.075X+7.81$, $r=0.9997$,线性范围 0.40~2.00 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3.4 TLLF 中主要成分定量分析 精密称取 TLLF 适量,按照上述色谱条件进行 HPLC 分析,测定三萜中主要萜类成分的质量分数,结果见图 2。由图可知,TLLF 中主要包含 OA 和 UA,两者在实验色谱条件下可达到良好分离(分离度 $R=2.21$),三萜中 OA 和 UA 所占的质量分数分别大于 55%和 23%。

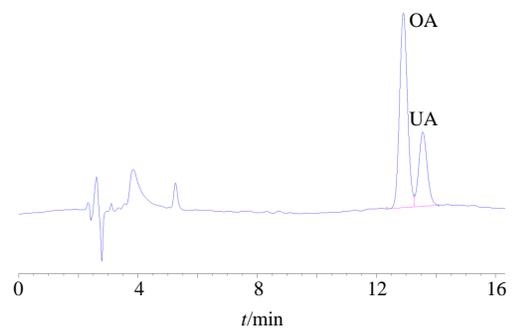


图 2 TLLF 的 HPLC

Fig. 2 HPLC of TLLF

2.4 固态表征

2.4.1 粉末 X 射线衍射 (PXRD) 分析 测试选取 Cu 靶 (40 kV, 40 mV); 2θ 角; 步进扫描 $0.02^\circ/\text{步}$; 扫描范围 $3.00^\circ\sim 40.00^\circ$; 扫描速率 $4^\circ/\text{min}$, 结果见图 3。PXRD 图谱显示, TLLF 呈现出多个晶体的特征衍射峰, 其中 13.38° 、 15.20° 为 OA 的晶体衍射峰, 14.20° 为 UA 的晶体衍射峰, 说明两者是以晶体形式存在于 TLLF 中。PIP 的晶体衍射峰分布在 $12^\circ\sim 30^\circ$, 呈现出多个明显的特征峰; 物理混合物中 TLLF 和 PIP 的晶体衍射峰强度减弱, 且伴有部分位移, 说明混合过程中 2 种成分之间发生了弱相互作用, 但主要晶体峰依旧存在, 说明简单的物理混合不能破坏药物的晶型结构; 而将 TLLF 和 PIP 通过溶剂法制备成复合物后, 两者特征晶体峰完全消失, 说明 TLLF 和 PIP 形成了共无定型, 且 TLLF 与 PIP 在 1:1、1.5:1 和 2:1 3 种质量配比下制备的复合物均呈现无定型态。

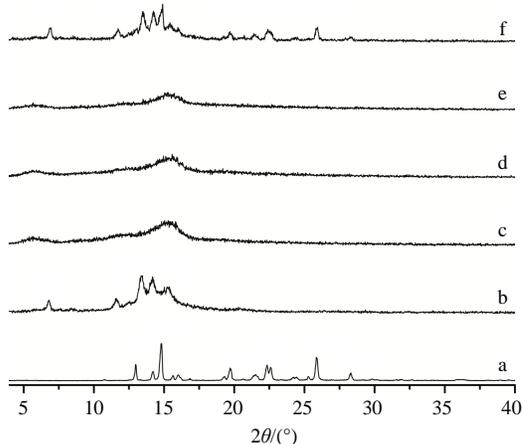


图 3 PIP 晶体 (a)、TLLF (b)、TLLF-PIP-CAC (1:1, c; 1.5:1, d; 2:1, e) 及 TLLF 和 PIP 物理混合物 (1:1, f) 的 PXRD 图谱

Fig. 3 PXRD patterns of crystalline PIP (a), TLLF (b), CAC of TLLF-PIP (1:1, c; 1.5:1, d; 2:1, e) and physical mixture (1:1, f)

2.4.2 热稳定性 将 3 种质量配比的 TLLF-PIP-CAC 分别在 4°C 和 40°C 下置于相对湿度 0% 的密闭环境中贮存, 90 d 后进行 PXRD 分析, 结果见图 4。稳定性考察结果表明, 3 个配比的 TLLF-PIP-CAC 在 4°C 下均未出现明显的晶体衍射峰, 说明冷藏条件下, 3 种复合物均具有良好贮藏稳定性。当温度提高至 40°C , TLLF-PIP-CAC (1.5:1 和 2:1) 分别在 13.2° 及 11.5° 附近呈现出特征晶体峰, 这表明这 2 类复合物出现了部分晶型转化, 而 TLLF-PIP-

CAC (1:1) 仍保持典型的晶体峰缺失形态, 这表明 TLLF-PIP-CAC (1:1) 具有良好的热稳定性, 实验选取质量比 1:1 的 TLLF-PIP-CAC 进行进一步的固体形态表征和分子间作用研究。

2.4.3 差示扫描量热法 (DSC) 分析 将 TLLF、UA、OA、PIP、TLLF-PIP-CAC (1:1) 和相同质量配比两者的物理混合物分别放置于铝制坩埚中, 在氮气保护下加热, 升温速率 $10.0^\circ\text{C}/\text{min}$, 升温范围 $40.0\sim 340.0^\circ\text{C}$, 进行 DSC 测试分析, 结果见图 5。DSC 图谱结果表明晶态 OA、UA 和 PIP 分别在 310.0 、 282.9 、 130.0°C 呈现出特征的熔点峰 (T_m)。在 TLLF 中 310.0 、 282.9°C 处的吸热峰仍然存在, 说明 TLLF 中主要存在为 OA 和 UA 晶体, 这与

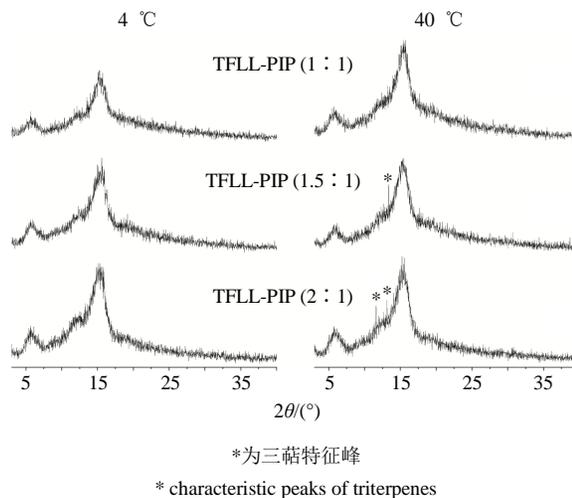


图 4 TLLF-PIP 各 CAC 在干燥环境下于 4°C 和 40°C 分别贮存 90 d 后的 PXRD 图谱

Fig. 4 PXRD of TLLF-PIP complex stored at 4°C and 40°C for over 90 d in a dry environment

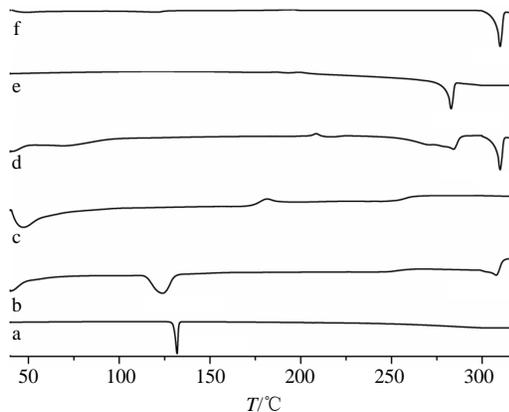


图 5 PIP (a)、物理混合物 (b)、TLLF-PIP-CAC (1:1, c)、TLLF (d)、UA (e) 和 OA (f) 的 DSC 图谱

Fig. 5 DSC thermograms of PIP (a), physical mixture (b), TLLF-PIP-CAC (1:1, c), TLLF (d), UA (e), and OA (f)

PXRD 测定结果相符。在 TLLF 和 PIP 的物理混合物中 PIP 和 OA 的特征熔点峰依旧清晰可见, 但峰形变宽, 峰位向低温方向偏移, 这可能是由于混合组分在测试的熔融条件下部分互溶或形成了共晶^[21]。与物理混合物相比, TLLF-PIP 复合物中未见各晶态成分的特征熔点峰, 提示 TLLF 与 PIP 形成了 CAC。

2.4.4 扫描电子显微镜 (SEM) 测试 SEM 技术可以用来观察固态物态的表面和晶体结构, 将 TLLF、

PIP、TLLF-PIP-CAC (1:1) 和两者的物理混合物分别固定在金属样品台, 真空下喷金 60 s, 进行 SEM 测试, 结果见图 6。TLLF 为不规则片状或块状, 局部可见针状结构, PIP 为典型的斜棱柱结构, 两者的物理混合物可以看见 PIP 和 TLLF 的特征晶态, 而将两者制备为共无定型, PIP 和 TLLF 的片状和斜棱柱状形态消失, 呈现出表面粗糙的类球形结构, 提示 TLLF 与 PIP 形成的复合物是一种非晶态混合物。

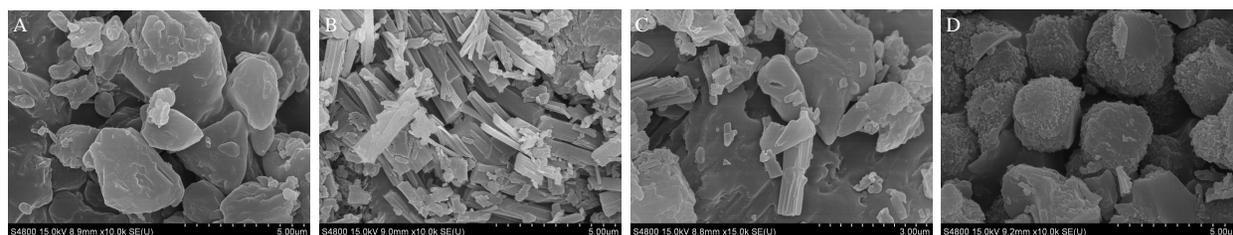


图 6 TLLF (A)、PIP (B)、物理混合物 (C) 和 TLLF-PIP-CAC (1:1, D) 的 SEM 图谱

Fig. 6 SEM photographs of TLLF (A), PIP(B), physical mixture (C), and TLLF-PIP-CAC (1:1, D)

2.5 分子间相互作用考察

傅里叶红外光谱 (FTIR) 分析被用于研究 TLLF 和 PIP 体系分子间的弱相互作用。分别将样品与适量溴化钾在干燥的环境下压制成片, 在 $400\sim 4\,000\text{ cm}^{-1}$ 波数范围内进行扫描, 绘制 FTIR 图谱 (图 7)。由图 7 结果可见, UA 中 $3\,530\text{ cm}^{-1}$ 为游离羟基的伸缩振动峰, 在 TLLF-PIP-CAC 中, 该振动峰峰型变宽, 且向低波数迁移至 $3\,425\text{ cm}^{-1}$, 说明 CAC 中 TLLF 的游离羟基作为质子的供体, 参与了氢键的形成^[22]。UA、OA 和 TLLF 中 $1\,717$ 、 $1\,696$ 、 $1\,697\text{ cm}^{-1}$ 为羰基的伸缩振动峰, 在物理混合物中该特征峰主要分布在 $1\,710\text{ cm}^{-1}$ 处, 且峰型尖锐, 而在 CAC 中, 该羟基吸收峰主要分布在 $1\,690\text{ cm}^{-1}$ 处, 这说明 TLLF 中的羧基在 CAC 中存在弱相互作用, 很可能与其他羰基基团形成了羧酸二聚体结构^[23]。PIP 的红外图谱中, $1\,688\text{ cm}^{-1}$ 为 PIP 中酰胺基团的羰基伸缩振动峰, 在形成共无定型后, 该峰强度明显减弱。

综合以上分析, 在 TLLF-PIP-CAC 中, TLLF 与 PIP 之间存在较强的非共价键相互作用, 三萜类物质可能以羟基 (C_3 或 C_{28} 位点) 为质子的供体与胡椒碱中的羰基 (C_1 位点, 质子受体) 形成了氢键缔合体。

2.6 药物饱和溶解度的测定

称取 UA、OA、PIP、TLLF-PIP-CAC 和两者的物理混合物适量, 分别重悬于蒸馏水中, 然后转移

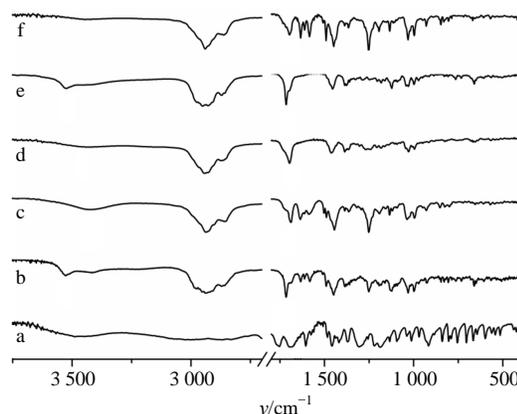


图 7 PIP (a)、物理混合物 (b)、TLLF-PIP-CAC (1:1, c)、TLLF (d)、UA (e) 和 OA (f) 的 FTIR 图谱

Fig. 7 FTIR spectra of PIP (a), physical mixture (b), TLLF-PIP-CAC (1:1, c), TLLF (d), UA (e), and OA (f)

至透析袋内 (截留相对分子质量为 3 500), 将透析袋分别放入 25 mL 盛有 pH 6.8 磷酸盐缓冲液 (PBS) 的称量瓶中, 置于恒温振荡器, 温度 $(37.0\pm 0.5)\text{ }^\circ\text{C}$, 速度 100 r/min, 振摇 36 h, 到达平衡后, 分别取透析液 5 mL, 样品经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 按照 “2.3.1” 项下色谱条件测定各溶解物的量, 计算饱和溶解度。

各药物的饱和溶解度见表 1, 由表可见, OA 和 UA 在 pH 6.8 的 PBS 中的饱和溶解度较低, 分别为 3.42 、 $3.17\text{ }\mu\text{g/mL}$, 物理混合物中, 两者的溶解度有所提升, 但相应组分的溶解度与晶体药物无显著性

表 1 药物在 37 °C pH 值为 6.8 的 PBS 中的饱和溶解度 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Saturated solubility of drugs in PBS (pH 6.8) at 37 °C ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	饱和溶解度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
	OA	UA	PIP
OA 晶体	3.42±0.37	—	—
UA 晶体	—	3.17±0.42	—
PIP 晶体	—	—	64.36±8.22
TLLF-PIP-CAC (1 : 1)	17.21±2.46	12.43±1.79	35.98±3.84
物理混合物	5.19±0.76	4.70±0.53	58.67±6.65

差别, TLLF 与 PIP 制备的共无定型复合物中, OA 与 UA 的溶解度分别为 17.21、12.43 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 饱和溶解度相对于各晶体药物分别提高了 5 倍和 4 倍。与 TLLF 溶解度提高相反, 制备成共无定型后, PIP 的溶解度显著降低, 由 64.36 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (晶体) 降至 35.98 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (CAC), 实验结果表明 CAC 能显著提高 TLLF 的饱和溶解度, 而不利于 PIP 的溶解。

2.7 药物的溶出度测定

称取 UA、OA、PIP、TLLF-PIP-CAC 和两者的物理混合物适量, 分别置于透析袋中 (截留相对分子质量为 3 500), 采用《中国药典》2015 年版四部溶出度测定法中浆法测定。转速 100 r/min, 温度 (37.0±0.5) °C, 释放介质为经脱气处理的 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 6.8), 分别于 5、10、15、30、60、90、120 min 取样 5 mL, 并及时补加等体积溶出介质。样品以 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液 20 μL 进行 HPLC 测定, 测定结果代入标准曲线计算质量浓度, 并换算成累积溶出率, 结果见图 8。由图 8-A 可见, 2 h 内, OA 和 UA 自 TLLF 中的累积溶出率分别为 34.8% 和 29.0%, 物理混合物中, 相应组分的溶出率与晶体药物无显著性差别, 将 TLLF 与 PIP 制备成 CAC 后, OA 和 UA 的累积溶出率分别为 96% 和 89%, 溶出量和溶出速率均得到显著提升。图 8-B 为 PIP 的累积溶出曲线, 由图可见, 在制备成 CAC 后, PIP 的溶出率显著性降低, 由 95% (晶体) 降至 42% (CAC), 实验结果表明, 共无定型体系有利于 TLLF 的溶出, 而对 PIP 的溶出却有所限制, 两者的释放呈现伴随释放。

3 讨论

药物的无定形态比晶态具有更高的溶解度, 可以促进吸收, 提高其口服生物利用度, 但单个无定型药物稳定性差, 在贮存和使用过程中无定型很容

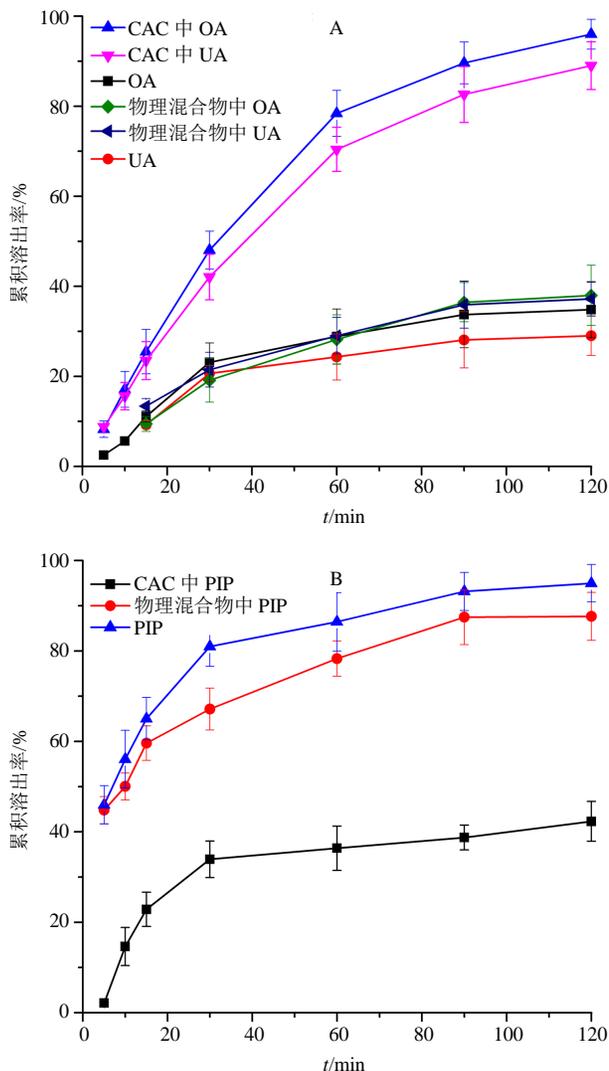


图 8 女贞子三萜和胡椒碱体系中女贞子三萜类组分 (A) 和胡椒碱 (B) 在 pH 6.8 的 PBS 中的溶出曲线

Fig. 8 Intrinsic dissolution profiles of TLLF (A) and PIP (B) in PBS (pH 6.8)

易转变为晶体状态而失去溶解优势, 因此, 共无定型体系逐渐替代了单个药物的无定型。中药制剂中引入共无定型药物体系的报道较少, 严红梅等^[24]将灯盏乙素与 PIP 通过溶剂法制备形成了 CAC, 显著改善了灯盏乙素和 PIP 的溶出度; 本课题组初步制备了 UA-PIP-CAC (另文待发表), 经测定该复合物具有良好的 pH 敏感释放特性。已报道的共无定型体系中无论是化学药物还是天然药物, 采用的均为药物单体, 但中药复方配伍中常采用药物提取物或药物有效部位, 药物成分复杂多样。本实验首次采用药物的有效部位进行共无定型研究, 从中药复方的制剂学角度探索药物之间的配伍关系。

制备共无定型常采用的方法有低温研磨、喷雾

干燥、淬火冷却和溶剂挥发法^[25]。实验最初采用低温球磨法制备 TLLF-PIP-CAC，相较于药物单体，TLLF 提取物黏度较大，药物的混合均匀性和可压性差，制备的复合物经 PXRD 检测仍呈现出大量晶体峰，粒子形态经 SEM 观察为无规则的碎片状和块状。采用溶剂挥发法制备共无定型复合物，方法简单易操作，制备的 TLLF-PIP-CAC 经 PXRD 检测，晶体峰消失完全，且混合物颗粒分散均匀（图 6）。溶剂的存在对形成均匀且小粒径的共无定型复合物具有促进作用^[26]，不同的溶剂甚至会影响共无定型的形成。课题组在前期的 UA-PIP-CAC 研究中利用溶剂挥发法分别以乙醇和甲醇为溶媒，制备了 4 种不同物质的量配比的共无定型复合物，以乙醇为溶媒的 CAC 与同药物配比以甲醇为溶媒的 CAC 相比，PXRD 图谱中晶体峰较为明显，说明乙醇并不是 TLLF-PIP-CAC 形成的最佳溶剂。溶剂在 CAC 形成中的这一区别可能与药物在溶剂中的溶解相关，部分溶剂分子甚至可能参与了药物分子间非共价键的形成。

将 TLLF 与 PIP 制备成 CAC 后，复合物内可能存在多种分子内和分子间氢键，由图 7 可知，TLLF 中游离羟基的伸缩振动峰在 3455 cm^{-1} ，相对于 UA 中相应基团的 3530 cm^{-1} 向低波数迁移，且峰形变宽接近消失，说明 TLLF 内部形成了以游离羟基为介导的分子内或分子间氢键。在 TLLF-PIP-CAC 中，羟基的特征吸收峰迁移至 3425 cm^{-1} ，且峰型变得更为尖锐，说明 TLLF 中分子与 PIP 形成了新的分子间氢键，显然，新生成的氢键更为稳固，是 TLLF-PIP-CAC 保持良好热稳定性和较高溶出度的主要原因。

共无定型体系中难溶性药物的溶出除了受无定型本身的高能态影响，还与形成共无定型的另一组分的溶解度相关。如果两组分之间有较强的相互作用，则可能会观察到药物的伴随^[27]或协同释放^[28]。TLLF-PIP-CAC 具有较强的分子间氢键，与“1+1>2”的协同释放效应不同，UA 和 OA 的溶出受溶解度较高的 PIP 影响，得到显著提升，而 PIP 的溶出受 UA 溶解的束缚，两者的释放呈现出伴随释放特性。

中医方剂配伍不仅体现在药物的组成，更重要的是反映于药物剂量的配伍变化。由于 PIP 具有良好的口服生物利用度增强效应，越来越多的研究者将 PIP 与难溶性药物配合使用。本研究中的 TLLF-

PIP-CAC 的稳定配比为 1:1（质量比），与前期研究中 UA-PIP-CAC 的稳定配比 1.5:1（物质的量比）及动物实验中两者的有效剂量相接近^[14-15]，然而这一稳定配比是否是 PIP 协同 TLLF 给药的最适配比，共无定型药物剂量与临床用药量是否适配仍需要进行进一步的验证。制成 CAC 后，TLLF 及 PIP 的溶解和溶出度得到极大提高，这种新型配伍作用可能会对其透膜转运、肝首过作用、药物的分布和代谢产生一定影响，而这种影响能否通过制剂配伍真正实现还有待进一步的实验研究。本研究将中药组分配伍和共无定型技术前沿领域的成果相融合，探索改善提高中药口服生物利用度的新方法。所构建的共无定型体系为中药难溶性药物的制剂配伍提供了新的思路，具有较高的研究价值和潜在应用前景。

参考文献

- [1] 张明发, 沈雅琴. 女贞子抗炎、抗肿瘤和免疫调节作用的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(5): 536-542.
- [2] 郭鱼波, 马如风, 王丽丽, 等. 女贞子治疗骨质疏松作用及其机制的研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(5): 851-856.
- [3] 彭小英, 李晴宇, 饶芳, 等. 复方女贞子降血糖作用的实验研究 [J]. 上海实验动物学, 2001, 21(2): 103-105.
- [4] Bazile D V. Nanotechnologies in drug delivery-an industrial perspective [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2014, 24(1): 12-21.
- [5] Soica C, Oprean C, Borcan F, et al. The synergistic biologic activity of oleanolic and ursolic acids in complex with hydroxypropyl- γ -cyclodextrin [J]. *Molecules*, 2014, 19(4): 4924-4940.
- [6] Gao Y, Li Z, Xie X, et al. Dendrimeric anticancer prodrugs for targeted delivery of ursolic acid to folate receptor-expressing cancer cells: Synthesis and biological evaluation [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2015, 70(5): 55-63.
- [7] Yang L, Sun Z, Zu Y, et al. Physicochemical properties and oral bioavailability of ursolic acid nanoparticles using supercritical anti-solvent (SAS) process [J]. *Food Chem*, 2012, 132(1): 319-325.
- [8] 祁雯, 施斌, 黄雄伟, 等. 熊果酸共晶固体分散体的体外特性研究 [J]. 中草药, 2013, 44(20): 2845-2851.
- [9] Löbmann K, Laitinen R, Grohgan H, et al. Coamorphous drug systems enhanced physical stability and dissolution rate of indomethacin and naproxen [J]. *Mol Pharm*, 2011, 8(5): 1919-1928.
- [10] Dengale S J, Hussien S S, Krishna B S M, et al.

- Fabrication, solid state characterization and bioavailability assessment of stable binary amorphous phases of ritonavir with quercetin [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, 89(??): 329-338.
- [11] Wairkar S, Gaud R. Co-amorphous combination of nateglinide-metformin hydrochloride for dissolution enhancement [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2016, 17(3): 673-681.
- [12] 刘 屏, 索婧侠, 于腾飞. 胡椒碱药理作用的研究进展 [J]. *中国药物应用与检测*, 2007, 4(3): 7-9.
- [13] Piyachaturawat P, Kingkaehoi S, Toskulkaio C. Potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity by piperine [J]. *Drug Chem Toxicol*, 1995, 18(4): 333-344.
- [14] Koul I B, Kapil A. Evaluation of the liver protective potential of piperine, an active principle of black and long peppers [J]. *Planta Med*, 1993, 59(5):413-417.
- [15] 张明发, 沈雅琴. 齐墩果酸和熊果酸保肝药理作用的研究进展 [J]. *抗感染药学*, 2012, 9(1): 13-22.
- [16] Ajazuddin A, Alexander A, Qureshi L, *et al.* Role of herbal bioactives as a potential bioavailability enhancer for active pharmaceutical ingredients [J]. *Fitoterapia*, 2014, 97: 1-14.
- [17] Khajuria A, Thusu N, Zutshi U. Piperine modulates permeability characteristics of intestine by inducing alterations in membrane dynamics: Influence on brush border membrane fluidity, ultrastructure and enzyme kinetics [J]. *Phytomedicine*, 2002, 9(3): 224-231.
- [18] 翟明君, 刘冰晶, 陈光英, 等. 海南暗罗枝和叶中总三萜酸的含量测定 [J]. *河南师范大学学报*, 2010, 23(4): 407-409.
- [19] 吕美红, 谢晓梅, 查孝柱, 等. 反相高效液相色谱法测定木瓜药材及饮片中齐墩果酸和熊果酸含量 [J]. *安徽中医学院学报*, 2010, 29(3): 72-75.
- [20] 吴冬梅. 高效液相色谱法测定蒙药葶苈散中胡椒碱的含量 [J]. *北方药学*, 2010, 7(6): 3-4.
- [21] Gao Y, Liao J, Qi X, *et al.* Coamorphous repaglinide-saccharin with enhanced dissolution [J]. *Int J Pharm*, 2013, 450(1/2): 290-295.
- [22] Heinz A, Strachan C J, Gordon K C, *et al.* Analysis of solid-state transformations of pharmaceutical compounds using vibrational spectroscopy [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2009, 61(8): 971-988.
- [23] Bellamy L J. *The Infra-Red Spectra of Complex Molecules* [M]. Dordrecht: Springer, 1975.
- [24] 严红梅, 汪 晶, 贾晓斌, 等. 灯盏乙素-胡椒碱共无定型复合物的制备及其体外释放度评价 [J]. *中草药*, 2015, 46(14): 2082-2086.
- [25] Dengale S J, Grohganz H, Rades T. Recent advances in co-amorphous drug formulations [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 100: 116-125.
- [26] Laitinen R, Löbmann K, Strachan C J, *et al.* Emerging trends in the stabilization of amorphous drugs [J]. *Int J Pharm*, 2013 453(1): 65-79.
- [27] Wairkar S, Gaud R. Co-amorphous combination of nateglinide-metformin hydrochloride for dissolution enhancement [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2016, 17(3): 673-681.
- [28] Allesø M, Chieng N, Rehder S, *et al.* Enhanced dissolution rate and synchronized release of drugs in binary systems through formulation: Amorphous naproxen-cimetidine mixtures prepared by mechanical activation [J]. *J Control Release*, 2009, 136(1): 45-53.